

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Arnold

Vliv střevní mikroflóry na činnost vyšších mozkových center

Effect of intestinal microflora on the activity of higher brain centers

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Mgr. Miroslav Hock, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 5. 2014

Tomáš Arnold

Poděkování:

Děkuji tímto svému školiteli Mgr. Miroslavu Hockovi, Ph.D. za ochotu, rady a cenné připomínky, které mi během psaní této práce poskytl. Dále své rodině a blízkým, kteří mi byli v průběhu psaní oporou.

Seznam zkratek

16S rRNA	komponenta malé podjednotky bakteriálního ribozomu
AMPs	antibakteriální peptidy (z angl. antimicrobial peptides)
ANS	autonomní nervová soustava/autonomní nervový systém
BDNF	mozkový neurotropní faktor (z angl. brain derived neurotrophic factor)
C-Fos	Protoonkogen patřící do Fos rodiny transkripčních faktorů
CD	diferenční skupina povrchových glykoproteinů
CNS	centrální nervový systém
CRH	kortikoliberin (z angl. corticotropin releasing hormon)
CRP	C-reaktivní protein
DNA	Deoxyribonucleic acid / Deoxyribonukleová kyselina
EAE	experimentální model zánětu mozku a míchy (z angl. experimental autoimmune encephalomyelitis)
ENS	enterický/střevní nervový systém
FST	test nuceného plavání (z angl. forced swim test)
GABA	γ -aminomáselná kyselina (z angl. γ -aminobutyric acid)
GF myši	bezmikrobní myši (z angl. germ free)
Gpr43	receptor spřažený s G proteinem kódovaný genem <i>ffar2</i> (free fatty acid receptor 2; receptor volných mastných kyselin)
HPA	hypotalamo-hypofyzární osa (z angl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
IBD	nespecifické střevní záněty (z angl. inflammatory bowel disease)
IBS	dráždivý tračník (irritable bowel syndrome)
IFN- γ	interferon γ
IgA	protilátky třídy IgA
IL	interleukin
NOD2	protein obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotidy typ 2 (z angl. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
OBx myši	myši, u kterých byly odstraněny olfaktorické bulby
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

peptid YY	peptid uvolňovaný z trávicího ústrojí a snižující chuť k jídlu
PSA	kapsulární polysacharid A
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
SCFA	krátké mastné kyseliny (z angl. short chain fatty acids)
SPF myši	myši osídlené definovanou střevní mikroflórou (z angl. specific pathogen free)
SSU rRNA	rRNA z malé ribozomální podjednotky
T-RFLP	polymorfismus terminálního restrikčního fragmentu (z angl. terminal restriction fragment length polymorphisms)
TGF- β	transformující růstový faktor β (z angl. transforming growth factor β)
T _h 1, T _h 2	pomocné T-lymfocyty typu 1 a 2 (z angl. helper)
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α (z angl. tumor necrosis factor α)
WAS	stres vyvolaný blízkou přítomností vody (z angl. water avoidance stress)

Abstrakt

Střevní mikroflóra se skládá z rozsáhlé bakteriální komunity, která sídlí ve střevech, především v tlustém střevě, a žije v symbióze s hostitelem. Je tvořena především zástupci čtyř bakteriálních kmenů (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes a Proteobacteria). Již bylo prokázáno, že se poměrné zastoupení bakteriálních kmenů v čase příliš nemění, ale výzkumy poslední dekády prokázaly nevyvratitelný vliv změny stravy na složení střevní mikroflóry. Navíc existují důkazy o změnách v zastoupení bakteriálních kmenů v průběhu rozvoje některých patologií střev, např. u nespecifických střevních zánětů. Čím dál tím více se začínají objevovat práce popisující vliv změněné střevní mikroflóry resp. jejích zástupců, na činnost a funkce CNS. Tato interakce trávicí soustavy a CNS se zdá být obousměrná a zprostředkovaná několika různými drahami. V neposlední řadě se ukazuje, že dysbióza střevní mikroflóry podporuje stavy úzkostí a deprese, které mohou vést až k nutkání předčasně ukončit život. Cílem této práce je poskytnout souhrnný pohled na tuto relativně mladou, ale především velmi zajímavou problematiku.

Klíčová slova: střevní mikroflóra, centrální nervový systém, dysbióza, IBS, IBD, chování organismu

Abstract

Intestinal microflora consists of large bacterial community that resides in the intestines, especially the colon, and lives in symbiosis with the host. It consists mainly representatives of the four bacterial strains (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria). It has already been shown that the proportional representation of the bacterial strains in time does not change much, but the research of the last decade have shown irrefutable effect between the change of diet and composition of the intestinal microflora. In addition, there is evidence of changes in the representation of bacterial strains in the course of development of certain intestinal pathologies such as inflammatory bowel disease. More and more are starting to emerge papers describing the influence of altered intestinal microflora respectively its representatives, on the activity and function of the CNS. This interaction of the digestive system and CNS seems to be bidirectional and mediated by several different pathways. Finally, it shows that dysbiosis of the intestinal microflora promotes anxiety and depression that can lead to the urge to prematurely terminate life. The aim of this work is to provide a comprehensive view of this relatively young, but also very interesting issue.

Keywords: intestinal microflora, central nervous system, dysbiosis, IBS, IBD, behavior of organism

Obsah

1. Úvod	9
2. Mikroflóra střev	11
2.1. Metody zjišťování bakterií střevní mikroflóry.....	11
2.2. Hlavní kmeny bakterií	11
2.3. Rozdělení střevní mikroflóry dle jejího umístění.....	12
2.4. Funkce střevní mikroflóry.....	13
2.5. Změny složení střevní mikroflóry při patologiích	14
2.5.1 Nespecifické střevní záněty	14
2.5.2 Dráždivý tračník.....	16
3. Interakce střev a centrální nervové soustavy	19
3.1. Jak ovlivňuje centrální nervová soustava mikroflóru střev	19
3.2. Jak ovlivňuje mikroflóra střev centrální nervový systém.....	20
4. Role střevní mikroflóry u roztroušené sklerózy	22
5. Chování organismu a role střevní mikroflóry v něm	23
5.1. Deprese a střevní mikroflóra.....	23
5.2. Úzkost a stres	24
6. Konkrétní látky ovlivňující činnost CNS a střev	25
7. Závěr	27
8. Seznam použité literatury	28

1. Úvod

Lidské tělo se skládá přibližně z 10^{12} buněk, což je jen těžko představitelné číslo. Podle různých odhadů jej však obývá dokonce 10krát více bakterií o celkové hmotnosti okolo 1 kg, přičemž převážná část se nachází v trávicí trubici a bývá souhrnně označována jako střevní mikroflóra. Ta je tvořena převážně čtyřmi bakteriálními kmeny. *Actinobacteria* (5%), *Bacteroidetes* (23%), *Firmicutes* (49%), *Proteobacteria* (21%). V závorkách je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých kmenů u zdravých lidí, které se za fyziologických podmínek v čase významně nemění. Bylo však prokázáno, že ke změnám ve složení střevní mikroflóry dochází při některých onemocněních trávicí soustavy, např. při nespecifických střevních zánětech (IBD, inflammatory bowel disease), nebo při dráždivém tračníku (IBS, irritable bowel syndrome). Ale významný vliv na zastoupení jednotlivých kmenů má také přijímaná potrava a v poslední době je stále častěji popisována obousměrná interakce mezi střevní mikroflórou a centrálním nervovým systémem (CNS).

Podle současných poznatků je nervový systém schopen přímo či nepřímo ovlivnit složení střevní mikroflóry a naopak zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů, respektive některých konkrétních druhů, má vliv na činnost CNS.

Přístup k výzkumu střevní mikroflóry ve vztahu k fyziologii je však relativně mladý, což dokazuje i fakt, že první komplexnější přehledný článek, který se věnuje tomu, jak střevní mikroflóra vypadá a jaký je její význam pro lidskou fyziologii pochází z roku 1997 (Macfarlane and Macfarlane, 1997). O efektu na centrální nervový systém se sice uvažovalo již v té době, ale studie na toto téma se začali objevovat až po roce 2000.

Centrální nervový systém představuje hlavní integrační a řídící orgán lidského těla. Zpracovává signály přicházející z vnějšího i vnitřního prostředí a podílí se společně s endokrinním a imunitním systémem na udržování stálého milieu, které je nezbytné pro správné fungování jednotlivých buněk i celého organismu. Informace o stavu vnitřních orgánů stejně jako o složení extracelulárních tekutin přichází do CNS humorální i neurální cestou. V případě trávicí soustavy reprezentuje nervovou dráhu především bloudivý nerv (X. hlavový nerv), který je považován za jednu z možných cest zprostředkovávající přímou interakci mezi střevní mikroflórou a CNS. Dále bylo popsáno ovlivnění střevní mikroflóry spojené s aktivací hypotalamo-hypofyzární osy

(HPA; hypothalamic-pituitary-adrenal axis), která představuje rozhraní mezi nervovým a endokrinním systémem a je zodpovědná za odpověď na stresové podněty. Mnohem překvapivější je však pozorovaný negativní vliv nepřítomnosti střevní mikroflóry na zrání HPA osy v průběhu postnatálního vývoje, který se projevuje zvýšenou aktivací HPA osy při běžných stresových podnětech. Kromě interakce na úrovni vegetativních funkcí byly popsány i účinky střevní mikroflóry na chování organismu, což bylo dosud demonstrováno zejména na myších.

Jak již bylo naznačeno, způsobů, jakými se vzájemně ovlivňují střevní mikroflóra a vyšší mozková centra, je více. Od zapojení nervových drah, endokrinního systému přes regulaci příjmu potravy až po interakci s imunitním systémem.

Cílem této bakalářské práce je zmapování vlivu onemocnění střev na jejich mikroflóru a tím i na organismus a jeho mozková centra. Dále podrobnější zjištění jakými mechanismy jsou přenášeny informace ze střev do mozku a naopak. A v neposlední řadě zda a jaký má střevní mikroflóra vliv na chování organismu. To, jaký má vliv střevní mikroflóra na roztroušenou sklerózu, přidávám z osobních důvodů jako zajímavost.

2. Mikroflóra střev

2.1. Metody zjišťování bakterií střevní mikroflóry

Počátky studia střevní mikroflóry byly závislé na kultivaci bakterií získaných ze stolice. Kultivace je však časově náročná metoda a docházelo tak ke zpomalení celého procesu. Navíc většina bakterií střevní mikroflóry (uvádí se 60-80 %) je nekultivovatelná (Suau et al., 1999). Proto se od klasických kultivačních metod postupně upustilo a přešlo se k novým kultivačně nezávislým molekulárně biologickým technikám, které jsou schopny poskytnout komplexnější informaci o složení střevní mikroflóry. V poslední době se ke studování složení střevní mikroflóry používá metoda označovaná jako T-RFLP (z angl. terminal restriction fragment length polymorphisms), která je rychlá a citlivá. Metoda je postavená na polymorfismu terminálních restrikčních fragmentů bakteriální DNA a sestává z několika následujících kroků: izolace DNA ze stolice, namnožení DNA pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce; z angl. polymerase chain reaction), štěpení restrikční endonukleázou a separace kapilárovou elektroforézou (Frank et al., 2007).

2.2. Hlavní kmeny bakterií

Střeva obývá velké množství různých bakterií. Byla prováděna širokospektrální kvantitativní PCR ze 190 vzorků získaných z biopsií střev. Poté byla provedena fylogenetická srovnávací analýza rRNA malých podjednotek bakteriálních ribozomů (SSU rRNA). Z této analýzy bylo zjištěno, že ve střevech jsou přítomni zástupci 4 kmenů bakterií: *Actinobacteria* (5%), *Bacteroidetes* (23%), *Firmicutes* (49%), *Proteobacteria* (21%; Frank et al., 2007).

Actinobacteria je kmen grampozitivních bakterií, které jsou primárně půdními bakteriemi. Z kmene *Actinobacter* se ve střevě nalézají třídy *Coriobacterium* a *Bifidobacterium*. *Bacterioidetes* jsou gramnegativní bakterie, přičemž hlavní třídy obývající střeva jsou *Bacteroidales* a *Flavobacteriales*. Kmen *Firmicutes* jsou převážně grampozitivní, ale někteří zástupci postrádají buněčnou stěnu, např. *Mycoplasma*. Střeva obývají rody *Lactobacillus*, *Clostridia*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* a *Erysipelotrichaceae* a další. Kmen *Proteobacteria* je složen z gramnegativních tříd. Z *Proteobacter* obývají střeva třídy α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* a γ -*Proteobacteria*. Nejširší zastoupení mají kmeny *Bacterioidetes* a *Firmicutes* (tabulka 1; Frank et

al., 2007). Všechny tyto kmeny pomáhají udržovat střevní homeostázi a přirozený průběh trávení (Gorkiewicz et al., 2013; Turnbaugh et al., 2007; Yang et al., 2013).

Kmen	Třída	Podtřída
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i> <i>Flavobacteriales</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i> <i>β-Proteobacteria</i> <i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycineae</i> <i>Corynebacteriaceae</i>	
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i> <i>Peptostreptococcaceae</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Planococcaceae</i>	

Tabulka 1: Fylogenetická distribuce SSU rRNA ve střevech zdravého člověka. Upraveno dle Frank et al., 2007.

2.3. Rozdělení střevní mikroflóry dle jejího umístění

Ve střevě je rozdělována mikroflóra na dvě skupiny. První skupinu tvoří bakterie rozptýlené ve střevě nebo navázané na jeho obsah, tzv. lumenální (angl. luminal). Druhá skupina je tvořena bakteriemi přisedlými na vrstvu hlenu na sliznici střeva (angl. mucosa-associated; Hong and Rhee, 2014).

Většinu střevní mikroflóry zastupuje první skupina bakterií, kam patří například třída *Enterococcus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, dále *Staphylococcus aureus* a *E. coli*. Hrají také kritickou úlohu v udržení homeostáze střev a jakékoliv narušení jejich složení má za následek nadýmání z důvodu fermentace karbohydrátů (cukrů) a vytváření plynu. Fermentace nestrávených cukrů vytváří krátké mastné kyseliny (SCFA z angl. short-chain fatty acid) a vedlejší produkty jako oxid uhličitý, vodík a metan. Produkují se i další metabolity a toxiny, které mohou interagovat s hostitelským imunitním systémem (Hong and Rhee, 2014).

Druhá skupina bakterií, ačkoli je méně početně zastoupena, ovlivňuje hostitele daleko více skrz interakce bakterie-imunitní systém (Kau et al., 2011). Jejimi zástupci jsou mimo jiné *Bifidobacterium catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. Bifidum*, *B. Longum*, *Pseudomonas aeruginosa*. Hlen, na kterém jsou tyto bakterie navázány, se skládá z glykosilovaných polysacharidů a glykokalyx, také obsahuje vazebné místa jak pro komenzální a symbiotické, tak pro patogenní bakterie. Tento systém pomáhá omezit přisedání na vrstvu střevního epitelu pod slizem. Bakterie, které se dostanou skrze hlenovou vrstvu až k epitelu s ním interagují pomocí toll-like receptorů (TLR; z angl. toll-like receptor) a NOD2 receptorů dendritických buněk. TLR jsou exprimovány jak na basolaterální, tak na apikální straně dendritických buněk, které prochází od lamina propria až do lumen střeva přes těsné spoje (angl. tight junctions). U hostitelů postižených IBS bylo pozorováno zvýšení exprese TLR-4 a TLR-5 a snížení exprese TLR-7 a TLR-8 (Hong and Rhee, 2014).

Patogenita bakterií záleží na reakci dendritických buněk. Buď dendritické buňky spustí protizánětlivou reakci pomocí IL-10 (interleukin 10) a TGF- β (transformující růstový faktor β), které mají protizánětlivé účinky a podporují jiný způsob imunitní reakce, nebo zareagují agresivně a naopak spustí zánětlivou reakci. Je potvrzeno, že bakterie z tříd *Bifidobacteria* a *Lactobacilli* stimulují produkci IL-10 a TGF- β a zároveň inhibují expresi prozánětlivých faktorů, například interferon- γ (IFN- γ) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α ; Bye et al., 2014; Hong and Rhee, 2014).

2.4. Funkce střevní mikroflóry

Obrana organismu je nejdůležitější funkcí střevní mikroflóry. Tuto roli zajišťuje mikroflóra hned několika způsoby. Působí jako mikrobiální bariéra proti patogenům, čehož dosáhne nejen

blokádou receptorů na sliznici trávicího ústrojí, ale i kompeticí o výživu. Střevní mikroflóra také produkuje bakteriostatických a bakteriocidních látek usmrtí případné patogeny (Zbořil et al. 2005).

Střevní mikroflóra zajišťuje správné trávení potravy, tedy vstřebání všech živin a minerálních látek přijatých s potravou. Zároveň střevní mikroflóra využívá nestrávené organické látky, pomáhá štěpit celulosu, podílí se na tvorbě látek důležitých pro zdraví organismu (vitamíny), škodliviny naopak reguluje (cholesterol) a také zlepšuje trávení bílkovin. Důležitou vlastností střevní mikroflóry je napomáhání trávení laktózy, protože s věkem člověk ztrácí schopnost laktózu vstřebat. Významnou funkcí střevní mikroflóry je ochrana před infekcemi tím, že posiluje integritu střevního epitelu a napomáhá produkci IgA (Zbořil et al. 2005).

Střevní mikroflóra má také vliv na produkci cytokinů (proteinů, pomocí kterých mezi sebou tělní buňky komunikují), čímž ovlivňuje funkci a rovnováhu aktivit imunitního systému a tím střevní mikroflóra zasahuje do humorální, buněčné a nespecifické imunity (Zbořil et al. 2005).

2.5. Změny složení mikroflóry při patologiích

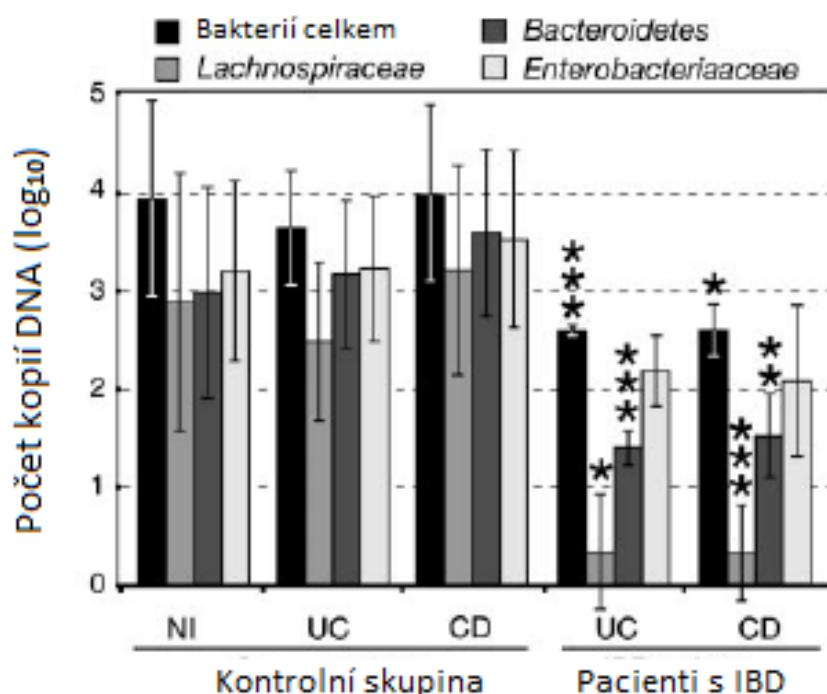
V následujících odstavcích budou uvedeny podrobnosti o dvou patologiích spojených se střevy - IBD a IBS. Obě choroby postihují nejen zdraví organismu a jeho vnitřní pochody, ale i složení střevní mikroflóry. Genetické faktory, které předurčují k zvýšené pravděpodobnosti projevu IBD, mají vliv i na projevy IBS. Porucha integrity střevního epitelu předchází IBD, zatímco u IBS je důsledkem buď předchozí infekce nebo stresu (Spiller and Lam, 2011).

2.5.1. Nespecifické střevní záněty

Pod nespecifické střevní záněty (IBD) spadají ulcerativní kolitida a Crohnova choroba a jsou doprovázeny bolestmi břicha, průjmem, úbytkem tělesné hmotnosti a krvácením z rektu. V souvislosti s tímto onemocněním se může projevovat chronický únavový syndrom, chronická bolest pánve, poruchy spánku a snížené libido (Sperber and Dekel, 2010).

Při těchto nemocích se mění složení mikroflóry střev z důvodu zvýšeného průtoku tekutin skrz střeva, vytváří se záněty, a s tím spojené hojení, a množí se bakterie pro klasickou mikroflóru

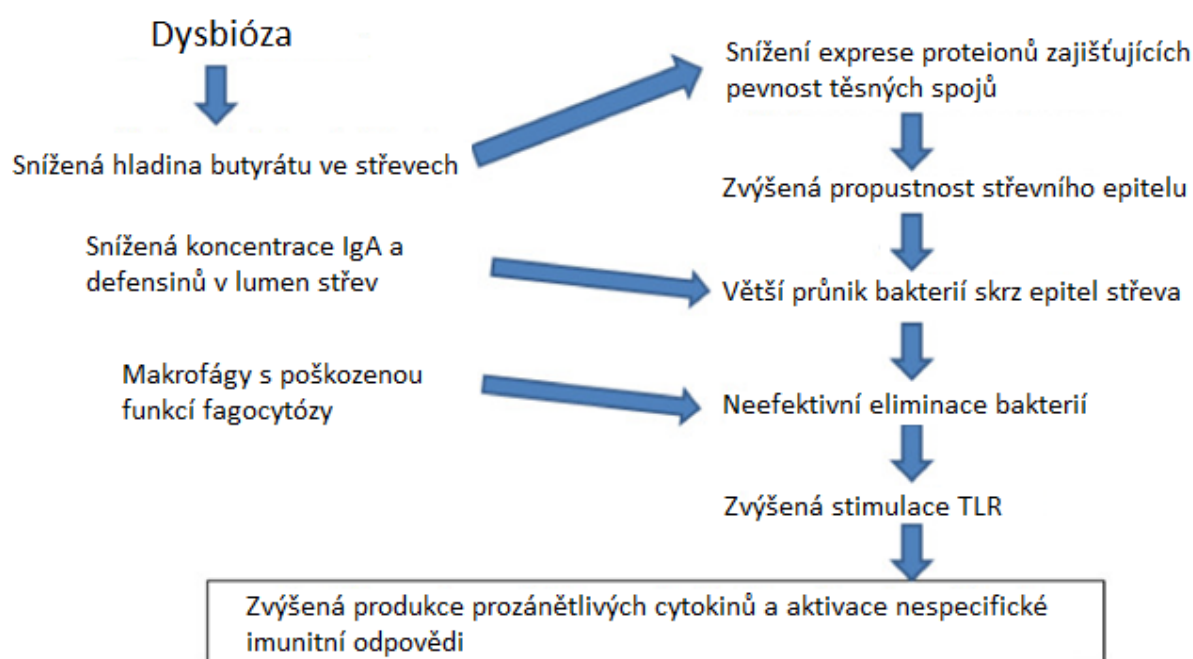
nebezpečné. Tomuto jevu se říká dysbióza. Množství bakterií v průběhu onemocnění klesá o 20-40 % oproti zdravým kontrolním skupinám (obrázek 1). Zkoumaná i kontrolní skupina byli pacienti ze školy medicíny v Mt. Sinai, kterým byl při operaci odebrán kousek (1,5 cm²) střeva. Vše probíhalo se souhlasem pacientů i příslušných autorit (Frank et al., 2007). Konkrétně je uváděno množení přilnavých a invazivních *E.Coli*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Clostridium difficile* a *Bacteroides fragilis*. Všechny z uvedených jsou velmi enterotoxické, tudíž jejich produkty narušují střevní epitel. Dále se snižuje zastoupení kmenu *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, naopak se zvyšuje zastoupení kmenů *Actinobacteria* a *Proteobacteria* (Comito et al., 2014).



Obrázek 1: Fylogenetická analýza SSU rRNA hlavních zástupců střevních bakterií za použití techniky kvantitativní PCR. V levých třech sloupečcích je relativní množství bakterií u kontrolních skupin. V pravých dvou sloupečcích je relativní množství bakterií u pacientů s IBS. Upraveno podle Frank et al., 2007.

V důsledku dysbiózy u IBD ubývá butyrátu v lumen střev a omezuje se exprese genů pro těsné spoje mezi buňkami střevního epitelu - zvýšení epiteliální permeability. Jakmile se zvýší počet bakterií, které se dostanou až k lamině propria, dojde k zvýšené stimulaci TLR na dendritických

buňkách, k výlevu prozánětlivých cytokinů a k aktivaci nespecifické imunitní odpovědi. Propustnost střevního epitelu je ještě zvýšena nedostatečnou expresí imunoglobulinů typu A (IgA), které tvoří přirozenou obranu proti patogenním bakteriím a pomáhají udržovat integritu střevního epitelu (obrázek 2; Comito et al., 2014).



Obrázek 2: Dysbióza a následné kroky vedoucí k zánětlivým reakcím z důsledku IBD. Upraveno podle Comito et al., 2014.

2.5.2. Dráždivý tračník

Dráždivý tračník je charakterizován bolestmi břicha, nevolností, nadýmáním a průjmem či zácpou. Jako u předchozí nemoci se mění složení mikroflóry v průběhu nemoci. Snižuje se zastoupení tříd *Lactobacilli* a *Bifidobacteria* a naopak se zvyšuje zastoupení *Streptokoků*, určitých druhů *E. Coli* a *Clostridií*. U pacientů s IBS bylo zjištěno zvýšené množství interleukinu 6 (IL-6) a interleukinu 8 (IL-8), což jsou silné prozánětlivé faktory a markery zánětlivých reakcí (Rajilic-Stojanovic et al., 2011).

Rajilić-Stojanović et al., 2011 dále publikoval celkový snížený počet bakterií ve vzorcích pacientů postižených IBS. Konkrétně téměř 50% úbytek bakterií kmene *Bacteroidetes*, 10% úbytek

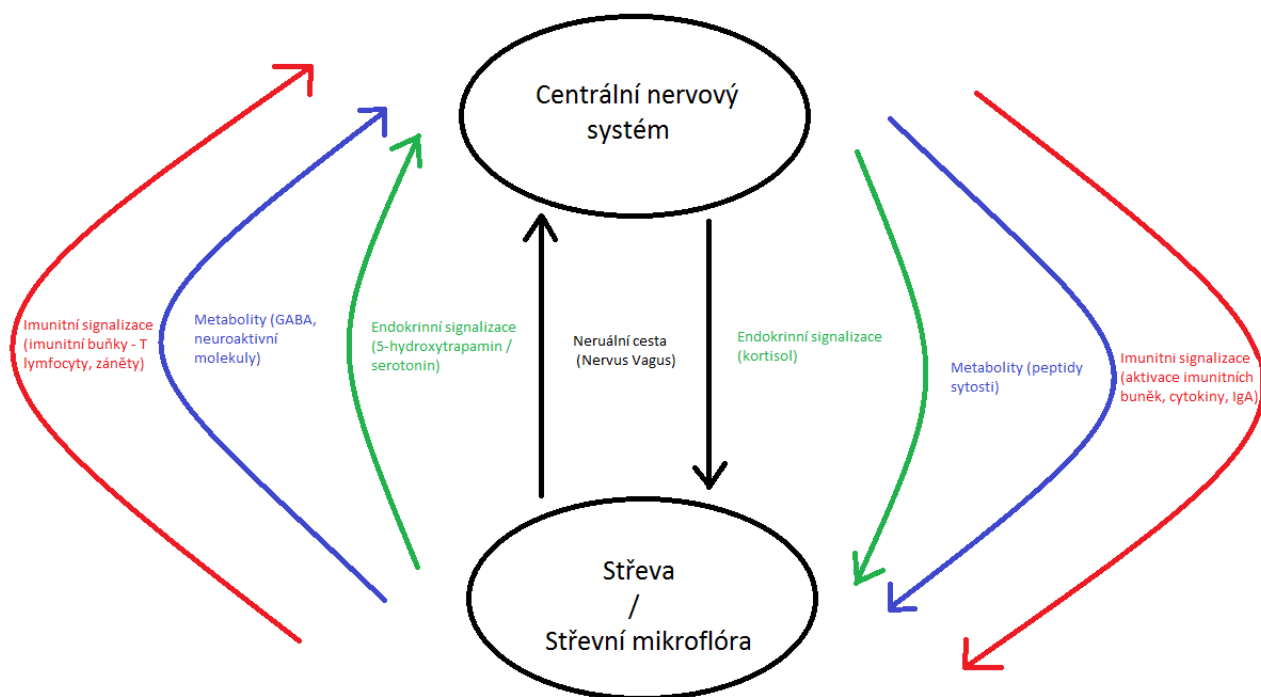
bakterií kmene *Actinobacteria* a 30% úbytek zástupců kmene *Bifidobacteria*. Naopak se mírně zvýšilo zastoupení (<5 %) kmene *Firmicutes*, hlavně z třídy *Clostridium*. Ve vzorcích pacientů s IBS se také objevovali netradiční bakterie tolerující kyslík. Konkrétně rodina *Streptococcaceae* a zástupci rodu *Aneurinibacillus* (viz. tabulka 2). Byla použita metoda 16S rRNA fylogenetické analýzy a kvantitativní PCR z 62 vzorků stolice pacientů s IBS a 46 kontrolních vzorků od zdravých dospělých lidí. Tato studie dokonce uvádí úbytek *Bifidobacterium catenulatum* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum* za možný marker IBS (Rajilic-Stojanovic et al., 2011)

Level 1	Level 2	Mean hybridization signal intensity				
		Controls	IBS	IBS-A	IBS-C	IBS-D
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	2498	1645 ^a	2107	1335	1516
Bacteroidetes	<i>Allistipes</i>	968	462 ^b	310 ^b	382 ^b	634
	<i>Bacteroides fragilis</i> et rel	666	455 ^b	437 ^a	338 ^b	553
	<i>Bacteroides intestinalis</i> et rel	1821	1090 ^b	1248 ^a	919 ^b	1092 ^a
	<i>Bacteroides ovatus</i> et rel	817	602 ^a	680	328 ^b	741
	<i>Bacteroides plebeius</i> et rel	2306	1141 ^b	1002 ^b	1127 ^b	1257 ^a
	<i>Bacteroides stercoris</i> et rel	733	532 ^a	656	729	297
	<i>Bacteroides uniformis</i> et rel	4856	2753 ^b	2041 ^b	2940 ^b	3159
	<i>Bacteroides vulgatus</i> et rel	3691	1789 ^b	2232 ^b	1429 ^b	1712 ^a
	<i>Odoribacter</i>	570	249 ^b	225 ^b	203 ^b	300 ^a
	<i>Parabacteroides</i>	1136	515 ^b	429 ^b	457 ^b	622 ^a
	<i>Prevotella oralis</i> et rel	696	417 ^b	750	230 ^b	300 ^a
	<i>Prevotella ruminicola</i> et rel	546	363 ^a	352	276 ^a	434
	<i>Prevotella tannerae</i> et rel	1181	619 ^b	657 ^b	633 ^b	580 ^b
	<i>Tannerella</i>	493	214 ^b	185 ^b	220 ^b	231 ^b
	Uncultured bacteroidetes	1083	266 ^b	122 ^b	180 ^a	438
Firmicutes						
Bacilli	<i>Aneurinibacillus</i>	2117	2848 ^b	2424	3241 ^b	2887
	<i>Streptococcus intermedius</i> et rel	834	1221 ^a	1502 ^a	994	1171
Clostridium cluster IV	<i>Anaerotruncus</i>	508	545	461	670 ^a	517
	<i>Clostridium cellulosi</i> et rel	1253	1525	1204	1881 ^a	1512
	<i>Clostridium leptum</i> et rel	1212	1499 ^a	1123	1865 ^b	1521
	<i>Clostridium orbiscindens</i> et rel	984	1209 ^b	1049	1398 ^b	1195 ^a
	<i>Faecalibacterium</i>	4184	3327	2376 ^a	3363	4025
	<i>Papillibacter</i>	2018	2707 ^b	2511 ^a	3060 ^b	2603
	<i>Ruminococcus bromii</i> et rel	2959	4044	2766	5422 ^b	4024
	<i>Ruminococcus callidus</i> et rel	1548	1554	1084 ^a	2016	1578
	<i>Sporobacter</i>	721	886	613	1178 ^b	883
Clostridium cluster I X	<i>Dialister</i>	107	330 ^a	271 ^a	321	382
	<i>Peptococcus</i>	750	1018 ^b	962	1114 ^b	992 ^a
Clostridium cluster XI	<i>Anaerovorax</i>	557	642 ^a	625	687 ^a	624
	<i>Clostridium difficile</i> et rel	167	248 ^b	212 ^a	329 ^b	217 ^a
Clostridium cluster XIVa	<i>Blautia</i>	3099	3784 ^b	4420 ^b	3590	3440
	<i>Bryantella</i>	1482	1817 ^b	1880 ^b	1850 ^a	1747
	<i>Butyrivibrio</i>	1093	1165	1116	1053	1283 ^a
	<i>Clostridium nexile</i> et rel	5537	6951 ^b	6902 ^b	7375 ^b	6682 ^a
	<i>Clostridium sphenoides</i> et rel	2388	2729	3023 ^a	2578	2615
	<i>Clostridium symbiosum</i> et rel	1658	2389 ^b	2440 ^b	2557 ^b	2230 ^b
	<i>Coprococcus eutactus</i> et rel	2545	3009 ^b	3086 ^a	3163 ^b	2841
	<i>Dorea</i>	2374	3181 ^b	3385 ^b	3293 ^b	2946 ^b
	<i>Lachnospira</i>	2878	3403 ^b	3343	3469 ^a	3400 ^a
	Outgrouping Clostridium cluster XIVa	1516	1731 ^a	2027 ^b	1506	1668
	<i>Roseburia</i>	2541	3533 ^a	3099	3493	3892 ^a
	<i>Ruminococcus gnavus</i> et rel	3101	4519 ^b	5027 ^b	4824 ^b	3912 ^a
	<i>Ruminococcus lactaris</i> et rel	949	1202 ^b	1118 ^a	1165	1293 ^b
Uncultured Clostridiales	Uncultured Clostridiales I	297	228 ^a	176 ^a	321	199

Tabulka 2: Rozdílné složení střevní mikrobioty u zdravých lidí a pacientů s IBS. Šedá pole označují bakterie, jejichž počet se výrazně snížil v důsledku IBS (Rajilic-Stojanovic et al., 2011).

3. Interakce střev a centrální nervové soustavy

Komunikace mezi střevy a CNS je obousměrná a je přenášena aferentními a eferentními dráhami, endokrinními signály, metabolity a imunologickými signály mezi CNS a gastrointestinálním traktem (obrázek 3; Romijn et al., 2008).



Obrázek 3: Schématické znázornění možných způsobů komunikace mezi střevní mikroflórou a CNS.

3.1. Jak ovlivňuje centrální nervový systém mikroflóru střev?

Prvním způsobem, jak CNS ovlivňuje střevní mikroflóru je skrz pocit sytosti. Tím ovlivňuje příjem potravy a množství živin, které střevní mikroflóra dostane a složení střevní mikroflóry. Peptidy signalizující sytost (peptid YY) jsou transportovány pomocí krve do mozku (Romijn et al., 2008).

Dále může CNS ovlivnit mikroflóru pomocí nervových a endokrinních signálů. Autonomní nervový systém (ANS) a HPA osa mohou měnit peristaltiku střev, sekreci slizu, propustnost střevního epitelu. Vysoká propustnost epitelu může mít za následek zánětlivé reakce (Cryan and Dinan, 2012). Přímé ovlivnění mikroflóry střev pomocí CNS může být pomocí neurotransmiterů,

například 5-hydroxytryptaminu, který je vypouštěn do lumen střev enterochromafinními buňkami, neurony a imunitními buňkami umístěnými v lamina propria. Byly použity GF myši, kterým se postupně osidlovali střeva klasickými střevními bakteriemi. Sledovali se hladiny tryptofanu a kynureninu v krevní plasmě a dalších látek (El Aidy et al., 2012).

U SPF myši, kterým byly odebrány čichové bulby (OBx), což je část mozku, do které přicházejí informace z čichových orgánů, se projevuje hypereaktivita na stresové agens. Konkrétně na water avoidance stress (WAS). Jako kontrolní skupina byly používány Sham myši. Při indukci stresu byla zjištěna zvýšená hladina kortikoliberinu (CRH). Byly studovány i feces myši, z nichž se izolovala RNA, pomnožila se (PCR) a provedla se elektroforéza. Výsledky elektroforézy se fylogeneticky porovnávaly. Byla zjištěna proporční změna v zastoupení jednotlivých kmenů bakterií. Expres protizánětlivých cytokinů se téměř nezměnila v průběhu testu. U OBx myši byla jak zvýšená produkce fekálií (až o 40 % oproti kontrole), tak i větší síla hladké svaloviny na mm² střevního epitelu (Park et al., 2013).

Také produkce signálních molekul, cytokinů a antibakteriálních peptidů (AMPs) do lumen střeva neurony, enteroendokrinními buňkami, imunitními buňkami a Panethovými buňkami na přímý nebo nepřímý popud CNS, má okamžitý dopad na složení mikrobioty střev (Rhee et al., 2009).

Vyhodnotí-li CNS situaci, ve které se organismus nachází jako stresovou, bývá téměř okamžitě poškozena integrita střevního epitelu, pozměněná pohyblivost trávicí trubice a zvýšená produkce katecholaminů a kortisolu, díky mechanismům bloudivého nervu, který má velmi krátkou reakční dobu. To vše má za následek změnu funkce střevní imunity a produkce cytokinů (Chen et al., 2013).

3.2. Jak ovlivňuje mikrobiota střev centrální nervový systém?

I zde je více cest, jak je cílový orgán ovlivňován. Neurálními signály, endokrinními a imunologickými mechanismy a metabolismy.

Nervové signály jsou ovládány hlavně enterickou nervovou soustavou (ENS) a bloudivým nervem. ENS je označení pro nervovou tkáň nacházející se v trávicí soustavě. Hlavní role ENS je kontrola trávení a regulace sekrece látek do trávicí trubice. Bloudivý nerv je desátým hlavovým nervem, který inervuje krční, břišní a hrudní dutiny. Receptory na neuronech bloudivého nervu

reagují na mnoho střevních peptidů a komponent zbytků potravy (de Lartigue et al., 2011). Nedávné studie ukazují na přímé interakce mezi střevní mikroflórou a neurony enterického nervového systému pomocí receptorů TLR-3 a 7 (rozeznávají virové RNA) a TLR-2 a 4 (rozeznávají peptidoglykany a polysacharidy; Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013). *Lactobacillus rhamonus* a *B. Fragilis* mohou aktivovat neurony bloudivého nervu pomocí svého produktu, kapsulárního polysacharidu A (capsular polysaccharide A, PSA; Mao et al., 2013).

Endokrinní signalizace mikroflóra-střeva hraje hlavní roli v regulaci a aktivaci HPA, která je důležitým faktorem při reakcích na stresové prostředí nebo situace. Enteroendokrinní buňky, které jsou rozestě po střevním epitelu mají schopnost sekretovat neurotransmitery a další signální peptidy jako odpověď na podněty z lumen střev a tak být endokrinními přenašeči signálů střeva-CNS (Rhee et al., 2009).

Metabolity mají významný vliv na fungování CNS, například (Ruddick et al., 2006) uvádí, že porucha v serotonergním a kynurenním metabolismu tryptofanu ovlivňuje průběh a závažnost demence, Huntingtonovy choroby a Alzheimerovy choroby. Obyvatelé střevní mikroflóry dokáží syntetizovat širokou škálu kompletních signalizačních molekul nebo molekul, které jsou za ně zaměnitelné (mimické). Konkrétně například serotonin, melatonin, gamma-aminomáselnou kyselinu (GABA), katecholaminy, histamin a acetylcholin (Barrett et al., 2012; Forsythe et al., 2010; Lyte, 2011).

Imunitní systém komunikuje s CNS naprosto nezávisle. Ačkoli je CNS považováno za imunitně privilegované místo (místo, kde se imunitní buňky nevyskytují) jsou v něm běžně nacházeny makrofágy a dendritické buňky. Konkrétně v choroidním plexu (vysoce prokrvená část mozku zodpovědná za výrobu mozkomíšního moku), mozkových blanách a u mikroglálních buněk mozkového parenchymu. Dále se objevují leukocyty v mozkomíšním moku. Určitá část střevní mikroflóry, která je známá svou schopností ovlivnit imunitní systém hostitele, podporuje autoreaktivitu periferních imunitních buněk na buňky CNS. (Berer and Krishnamoorthy, 2012; Rook et al., 2011) Na CNS mají také vliv imunitní látky, které se vyplavují při neuropsychických nemocích, například deprese. To jsou například C-reaktivní protein (CRP) IL-1, IL-6 a TNF- α . Produkce a vyplavování těchto faktorů navíc podporuje vytváření zánětů (Dantzer et al., 2008; Rook et al., 2011).

Jedním z nejpřesvědčivějších důkazů toho, že střevní mikroflóra ovlivňuje chování organismů, je studie Bercik et al., 2011. Podstatou bylo „vyměnění“ střevního obyvatelstva mezi dvěma kmeny laboratorních myší. Konkrétně BALB/c myši (původem z New Yorku) a NIH swiss myši (původem z Marylandu). K uskutečnění tohoto počínu, bylo nutné zajistit bezmikrobní myši (angl. GF z germ free), proto před samotným experimentem byla myším po dobu 7 dnů podávána neabsorbovatelná antibiotika (neomycin, bacitracin a pimaricin). Poté se uskutečnilo osidlování střev mikroflórou z jiného kmene. GF BALB/c myším bylo střevo osidlováno mikroflórou z SPF (z angl. specific pathogen free) HIN swiss myši a naopak. Samotná sterilizace střev jakýchkoliv SPF myši pomocí antibiotik podpořila průzkumné chování myši, snížila strach z neznámého prostředí a zvýšila expresi hipokampálního mozkového neurotrofního faktoru (BDNF). Nejdůležitější částí tohoto výzkumu bylo porovnání chování klasických SPF myši s těmi, co měli uměle osídlená střeva z druhého kmene. BALB/c myši, které měli NIH swiss mikroflóru více prozkoumávali okolí a měli vyšší koncentrace BDNF v hipokampu. NIH swiss myši, jejichž mikroflóra pocházela z BALB/c myši měli naopak strach z objevování (Bercik et al., 2011a).

4. Role střevní mikroflóry u roztroušené sklerózy.

Roztroušená skleróza je autoimunitní onemocnění, kde buňky imunitního systému demyelinizují vlákna neuronů, které se stávají nefunkčními. Ačkoli studie pracují hlavně s encefalomyelitidou (EAE, souhrnné označení pro zánětlivá onemocnění mozku a míchy), konkrétně s experimentální autoimunitní encefalomyelitidou může být předpokládán podobný vliv na roztroušenou sklerózu (Baxter, 2007). Jak se uvádí ve studii (Lee et al., 2011) správné složení komensálních bakterií ve střevech snižují hladiny IFN- γ a IL-17 (známé prozánětlivé faktory). Modulace střevní mikroflóry pomocí antibiotik řídí průběh EAE prostřednictvím různých buněčných mechanismů. Studie Ochoa-Reparaz et al., 2009 uvádí, že podávání upravených Treg CD4⁺ lymfocytů, které produkují IL-10 (protizánětlivý faktor) zpomaluje postup šíření EAE. V následující studii stejného autora (Ochoa-Reparaz et al., 2010) je uvedeno, že orální podávání antibiotik vede k nárůstu aktivity CD5⁺ B buněčného typu. Tento buněčný typ má protizánětlivé mechanismy a tím brání dalšímu rozšiřování EAE. Přestože není úplně známo, zda zástupci střevního obyvatelstva mají přímý vliv na roztroušenou sklerózu, vysoké procento pacientů mělo zvýšenou reaktivitu proti gastrointestinálním protilátkám oproti kontrolní skupině.

Z toho lze usuzovat změnu ve složení střevní mikroflóry a také zvýšenou imunitní reakci v oblasti střev (Banati et al., 2013).

Jak prokázalo již mnoho studií ústní podávání jednoho určitého kmene bakterií nebo mixu více kmenů má vliv na EAE. Konkrétně podávání probiotické *Bifidobacterium animalis* snižovalo dobu, po kterou měly myši, u kterých bylo uměle EAE vyvoláno, symptomy EAE (Ezendam et al., 2008). Jelikož je spojování střevní mikroflóry a mozkových chorob ještě ve svých počátcích, objevují se i navzájem protichůdné studie. Ezendam and van Loveren (2008) uvádí, že druh *Lactobacillus casei Shirota* zhoršuje příznaky EAE, naopak Maassen and Claassen (2008) naznačují, že rod *Lactobacilli* včetně druhu *Lactobacillus casei Shirota* působí na EAE dokonce pozitivně.

5. Chování organismu a role střevní mikroflóry v něm

Ačkoli je tento obor velice mladý už se stačilo nahromadit slušné množství studií, které potvrzují vliv střevní mikroflóry na chování organismu. Na práce v tomto oboru jsou bohužel stále používány převážně modelové organismy (myši / potkani). Důsledkem je etická nekorektnost experimentů na lidech. Deprese, úzkost a stres jsou hlavní poruchy nálad, na které se většina studií zaměřuje.

5.1. Deprese a střevní mikroflóra

Deprese je jedna z hlavních forem poruch nálady, která má za následek neuropsychickou nerovnováhu a narušení imunitních mechanismů (Dantzer et al., 2008). Podávání probiotik, hlavně bakterií z kmene *Lactobacillus*, snižuje závažnost depresí. Probiotická kultura obsahující *L. rhamnosus* a *L. helveticus* snižují míru stresu vyrovnáváním narušené hladiny kortikosteronu (Gareau et al., 2007). Podobně *L. Rhamnosus* snižuje stresové chování nejen regulováním hladiny kortikosteronu, ale i GABA receptorů v bloudivém nervu. Podávání probiotik obsahujících zástupce z kmene *Bifidobacterium* je také potencionálním antidepresantem. *Bifidobacterium infantis* zmírňuje depresi u myší, které byly podrobovány nucenému plavání (forced swim test - FST) a odloučení od matek (maternal separation). Hlavními mechanismy byla atenuace prozánětlivých cytokinů, regulace v metabolismu tryptofanu a neurotransmiterů CNS

(Desbonnet et al., 2008; Desbonnet et al., 2010). Probiotika kombinující *L. helveticus* a *Bifidobacterium longum* mají také, jak se dá předpokládat antidepresivní účinky a k předchozím uvedeným mechanismům má tato kombinace navíc potenciál obnovování střevního epitelu (Arseneault-Breard et al., 2012; Gilbert et al., 2013). I dieta obsahující vysoké množství polynenasycených mastných kyselin pomáhá zmírnit depresivní chování (Dinan and Cryan, 2012).

5.2. Úzkost a stres

Úzkost a stres jsou běžné poruchy nálad, na kterých se podílí nervový systém, endokrinní signalizace a imunologické procesy. Vystavení chemickým, biologickým či přírodním stresovým agens aktivuje mimo jiné HPA osu (Dinan and Cryan, 2012). Myši, které byly uměle vychovány bez jakýchkoliv bakterií (GF-mouse, germ-free), vykazují zvýšenou motorickou aktivitu a snížené projevy úzkosti spojené s objevováním okolí oproti myším, které mají pouze určité bakterie (SPF-mouse, specific-pathogen-free) a normální obyvatelstvo střev. U GF myši byly pozorovány zvýšené hladiny neurotransmiterů a snížená dlouhodobá potenciace (zesílení signálů) CNS (Diaz Heijtz et al., 2011). Studie prováděné za podobných podmínek potvrzující předchozí poznatky (Neufeld et al., 2011), navíc uvádějí nižší hladiny receptorů pro neurotransmitery a stimulaci metabolismu tryptofanu u GF myši oproti SPF myším. Určité střevní patogenní bakterie, například rod *Campylobacter jejuni* (kmen *Proteobacteria*), podporují úzkostlivé chování přes indukci (expresi) c-Fos proteinu. C-Fos protein je nervový aktivační marker jak v CNS tak v ANS (Gaykema et al., 2004; Goehler et al., 2008). Indukci c-Fos proteinu podporuje i *Citrobacter rodentium* (Lyte et al., 2006). Na druhou stranu určité druhy *B. longum*, *B. infantis*, *L. helveticus*, nebo *L. Rhamnosus* samotné či v kombinaci normalizují projevy strachu a úzkosti u zvířecích modelů (Bercik et al., 2011b; Bravo et al., 2011).

Změna aktivity HPA osy díky střevní mikroflóře je také pozorována při vystavování stresovým situacím. GF myši projevovali zvýšenou reaktivitu HPA spojenou s nadbytkem cirkulujících neurotransmiterů oproti SPF myším (Sudo, 2012).

Myši, které byly vystaveny stresové situaci z důvodu separace od matky, měli pozměněnou střevní mikroflóru (fekální vzorek) oproti kontrolní, neseparované skupině. Výrazně se snížilo zastoupení *Bacteroidetes*, naopak zvýšilo zastoupení *Clostridií* (O'Mahony et al., 2009).

6. Konkrétní látky ovlivňující činnost CNS a střev

Změny v práci mozku a prodloužené míchy jsou výsledkem mnoha faktorů. Metabolity a s nimi spojená endokrinní signalizace zde mají výrazné zastoupení. Zde jsou uvedeny příklady látek, které ovlivňují CNS jak přímo tak nepřímo.

Leptin slouží k regulaci chuti k jídlu, ke správnému vstřebávání glukózy, správnému fungování brzlíku a pomáhá k dominanci T_H1 buněk nad T_H2 buňkami a inhibuje proliferaci regulačních T lymfocytů. Nízká hladina leptinu může mít za následek sníženou buněčnou imunitu. Respektive zhoršení proliferace T lymfocytů a jejich exprese cytokinů, dále snížení hladiny aminokyselin například tryptofanu, argininu, glutaminu, cysteinu (Biesiada et al., 2012).

Krátké mastné kyseliny (SCFA) jsou konečné produkty bakteriálního kvašení zbytků potravy. Člověk je nedokáže s využitím vlastního genomu trávit. Od toho tu je střevní mikroflóra. SCFA mají velký vliv na imunitní reakce.

Butyrát mění produkci cytokinů u T_H (helper) buněk a podporuje nepropustnost střevního epitelu. Z toho vyplývá omezení expozice epitelu patogenním bakteriím a tedy snížení zánětlivých reakcí ve střevě.

Acetát pomocí G protein spřaženého receptoru (Gpr43) napomáhá k urychlení průběhu zánětlivé reakce a k jejímu hojení. Jako butyrát i acetát udržuje stabilnější střevní sliznici.

Střevní bakterie jsou producenty přibližně 95 % celkového 5-hydroxytryptaminu (serotoninu) v lidském organismu, což je kriticky důležitý neurotransmitter modulující jak motilitu střev, tak chování (Sommer and Backhed, 2013).

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony tvořené kůrou nadledvin, jejich tvorbu řídí přední lalok hypofýzy. Hlavními zástupci jsou kortisol a kortikosteron. Jsou to silná antiflogistika, čili léky na potlačení zánětlivých reakcí.

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) je protein patřící do neurotrofní rodiny růstových faktorů. Jeho hlavní funkcí je zajistit přežívání, růst a diferenciaci nových neuronů a synapsí v oblasti hypokampu, mozkové kůry a bazálního předního mozku, které jsou zodpovědné za paměť, učení a vyšší mozkové funkce. BDNF je také důležitý pro dlouhodobou paměť (Bercik et al., 2011a).

7. Závěr

V této práci byly shrnuty nejnovější poznatky o střevní mikroflóře, jejích změnách při patologiích a vlivu těchto změn na činnost vyšších mozkových center. V bakalářské práci byl zmapován vliv vybraných patologií střev (IBS, IBD) na jejich mikroflóru, organismus a centrální nervovou soustavu. Výzkumy prokázaly markantní úbytek objemu střevní mikroflóry i její diverzity u obou chorob, přičemž u IBD se mírně zvýšilo poměrné zastoupení bakteriálního kmene *Actinobacteria*, zatímco u IBS se poměrné zastoupení stejného kmene snížilo až o 10 %.

V práci je uveden nejen přehled látek majících vliv na přenos informací jak ze střev do mozku i z mozku do střev ale i způsoby (dráhy) kterými se dané informace šíří. Pozoruhodným způsobem přenosu informací je komunikace CNS se střevní mikroflórou přes složky imunitního systému, protože se CNS obecně považuje za imunitně privilegované místo.

Řada studií také prokázala, že střevní mikroflóra ovlivňuje chování a nálady organismu. Dysbióza střevní mikroflóry podporuje stavy úzkostí a deprese, které mohou vést až k nutkání předčasně ukončit život.

Osobní důvody vedly autora k tomu, že zvláštní pozornost věnoval vlivu střevní mikroflóry na roztroušenou sklerózu. Dosavadní poznatky svědčí o tom, že změna složení střevní mikroflóry, a s tím spojené snížení hladin prozánětlivých faktorů, může mít pozitivní efekt na průběh roztroušené sklerózy.

8. Seznam použité literatury

- Arseneault-Breard, J., Rondeau, I., Gilbert, K., Girard, S.A., Tompkins, T.A., Godbout, R., and Rousseau, G. (2012). Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *The British journal of nutrition* 107, 1793-1799.
- Banati, M., Csecsei, P., Koszegi, E., Nielsen, H.H., Suto, G., Bors, L., Trauninger, A., Csepany, T., Rozsa, C., Jakab, G., *et al.* (2013). Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 20, 1492-1495.
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., and Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57, 1013-1023.
- Barrett, E., Ross, R.P., O'Toole, P.W., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2012). gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of applied microbiology* 113, 411-417.
- Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews Immunology* 7, 904-912.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., *et al.* (2011a). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141, 599-609, 609 e591-593.
- Bercik, P., Park, A.J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., Deng, Y., Blennerhassett, P.A., Fahnestock, M., Moine, D., *et al.* (2011b). The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23, 1132-1139.
- Berer, K., and Krishnamoorthy, G. (2012). Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta neuropathologica* 123, 639-651.
- Biesiada, G., Czepiel, J., Ptak-Belowska, A., Targosz, A., Krzysiek-Maczka, G., Strzalka, M., Konturek, S.J., Brzozowski, T., and Mach, T. (2012). Expression and release of leptin and proinflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis and infectious diarrhea. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 63, 471-481.

Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., and Cryan, J.F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 16050-16055.

Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., *et al.* (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* *145*, 1323-1333.

Bye, W., Ishaq, N., Bolin, T.D., Duncombe, V.M., and Riordan, S.M. (2014). Overgrowth of the indigenous gut microbiome and irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology : WJG* *20*, 2449-2455.

Comito, D., Cascio, A., and Romano, C. (2014). Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian journal of pediatrics* *40*, 32.

Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews Neuroscience* *13*, 701-712.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews Neuroscience* *9*, 46-56.

de Lartigue, G., de La Serre, C.B., and Raybould, H.E. (2011). Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiology & behavior* *105*, 100-105.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., and Dinan, T.G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of psychiatric research* *43*, 164-174.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* *170*, 1179-1188.

Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., and Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 3047-3052.

Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2012). Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* *37*, 1369-1378.

El Aidy, S., Kunze, W., Bienenstock, J., and Kleerebezem, M. (2012). The microbiota and the gut-brain axis: insights from the temporal and spatial mucosal alterations during colonisation of the germfree mouse intestine. *Beneficial microbes* 3, 251-259.

Ezendam, J., de Klerk, A., Gremmer, E.R., and van Loveren, H. (2008). Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clinical and experimental immunology* 154, 424-431.

Ezendam, J., and van Loveren, H. (2008). *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice. *The British journal of nutrition* 99, 83-90.

Forsythe, P., Sudo, N., Dinan, T., Taylor, V.H., and Bienenstock, J. (2010). Mood and gut feelings. *Brain, behavior, and immunity* 24, 9-16.

Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13780-13785.

Gareau, M.G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 56, 1522-1528.

Gaykema, R.P., Goehler, L.E., and Lyte, M. (2004). Brain response to cecal infection with *Campylobacter jejuni*: analysis with Fos immunohistochemistry. *Brain, behavior, and immunity* 18, 238-245.

Gilbert, K., Arseneault-Breard, J., Flores Monaco, F., Beaudoin, A., Bah, T.M., Tompkins, T.A., Godbout, R., and Rousseau, G. (2013). Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. *The British journal of nutrition* 109, 50-56.

Goehler, L.E., Park, S.M., Opitz, N., Lyte, M., and Gaykema, R.P. (2008). *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, behavior, and immunity* 22, 354-366.

Gorkiewicz, G., Thallinger, G.G., Trajanoski, S., Lackner, S., Stocker, G., Hinterleitner, T., Gully, C., and Hogenauer, C. (2013). Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PloS one* 8, e55817.

Hong, S.N., and Rhee, P.L. (2014). Unraveling the ties between irritable bowel syndrome and intestinal microbiota. *World journal of gastroenterology : WJG* 20, 2470-2481.

- Chen, X., D'Souza, R., and Hong, S.T. (2013). The role of gut microbiota in the gut-brain axis: current challenges and perspectives. *Protein & cell* 4, 403-414.
- Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L., and Gordon, J.I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327-336.
- Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S.K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1, 4615-4622.
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 574-581.
- Lyte, M., Li, W., Opitz, N., Gaykema, R.P., and Goehler, L.E. (2006). Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiology & behavior* 89, 350-357.
- Maassen, C.B., and Claassen, E. (2008). Strain-dependent effects of probiotic lactobacilli on EAE autoimmunity. *Vaccine* 26, 2056-2057.
- Mao, Y.K., Kasper, D.L., Wang, B., Forsythe, P., Bienenstock, J., and Kunze, W.A. (2013). *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nature communications* 4, 1465.
- Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J.A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23, 255-264, e119.
- O'Mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.M., Quigley, E.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological psychiatry* 65, 263-267.
- Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Foureau, D.M., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2009). Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 183, 6041-6050.
- Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2010). Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora. *Gut microbes* 1, 103-108.

- Park, A.J., Collins, J., Blennerhassett, P.A., Ghia, J.E., Verdu, E.F., Bercik, P., and Collins, S.M. (2013). Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 25, 733-e575.
- Rajilic-Stojanovic, M., Biagi, E., Heilig, H.G., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., and de Vos, W.M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141, 1792-1801.
- Rhee, S.H., Pothoulakis, C., and Mayer, E.A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 6, 306-314.
- Romijn, J.A., Corssmit, E.P., Havekes, L.M., and Pijl, H. (2008). Gut-brain axis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 11, 518-521.
- Rook, G.A., Lowry, C.A., and Raison, C.L. (2011). Lymphocytes in neuroprotection, cognition and emotion: is intolerance really the answer? *Brain, behavior, and immunity* 25, 591-601.
- Ruddick, J.P., Evans, A.K., Nutt, D.J., Lightman, S.L., Rook, G.A., and Lowry, C.A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert reviews in molecular medicine* 8, 1-27.
- Sommer, F., and Backhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology* 11, 227-238.
- Sperber, A.D., and Dekel, R. (2010). Irritable Bowel Syndrome and Co-morbid Gastrointestinal and Extra-gastrointestinal Functional Syndromes. *Journal of neurogastroenterology and motility* 16, 113-119.
- Spiller, R., and Lam, C. (2011). The shifting interface between IBS and IBD. *Current opinion in pharmacology* 11, 586-592.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., and Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology* 65, 4799-4807.
- Sudo, N. (2012). Role of microbiome in regulating the HPA axis and its relevance to allergy. *Chemical immunology and allergy* 98, 163-175.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.

Yang, I., Eibach, D., Kops, F., Brenneke, B., Woltemate, S., Schulze, J., Bleich, A., Gruber, A.D., Muthupalani, S., Fox, J.G., *et al.* (2013). Intestinal microbiota composition of interleukin-10 deficient C57BL/6J mice and susceptibility to *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *PloS one* 8, e70783.

Zbořil, Vladimír. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 153 s. ISBN 80-247-0584-2.